

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der
Universität Marburg
Komm. geschäftsf. Direktor: Prof. Dr. R. Hilgermann

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN NACHWEIS DER
FAKTOREN Gm (1), (2), (4), (5), (10), (21) UND Inv (1)
AN BLUT- UND SPERMASPUREN AUF TEXTILIEN
IN ABHÄNGIGKEIT VON HITZE-EINWIRKUNG,
UV-BESTRAHLUNG UND FEUCHTIGKEITS-EXPOSITION

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von —

WOLFGANG-DIETER FRIEDRICH
—
aus Münster/Westfalen

Marburg 1977
—

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der
Universität Marburg
Komm. geschäftsf. Direktor: Prof. Dr. R. Hilgermann

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN NACHWEIS DER
FAKTOREN Gm (1), (2), (4), (5), (10), (21) UND Inv (1)
AN BLUT- UND SPERMASPUREN AUF TEXTILIEN
IN ABHÄNGIGKEIT VON HITZE-EINWIRKUNG,
UV-BESTRAHLUNG UND FEUCHTIGKEITS-EXPOSITION

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

WOLFGANG-DIETER FRIEDRICH
aus Münster/Westfalen

Marburg 1977

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen im Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 27. 5. 1977

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. F. Neurath

Referent: Prof. Dr. I. Oepen

Correferent: Prof. Dr. F. Schleyer

I n h a l t

	Seite
A. <u>Einleitung</u>	
I. Immunglobuline und Allotypen der schweren und leichten Ketten	5
II. Bisher vorliegende Befunde	8
III. Fragestellung	10
B. <u>Eigene Untersuchungen</u>	
I. <u>Material</u>	12
a) Blut	12
b) Sperma	12
II. <u>Methode</u>	13
a) Gm- und Inv (1)-Bestimmung im Serum	14
b) Gm-Bestimmung von Blutspuren auf ver- schiedenen Spurenträgern	16
c) Gm- und Inv (1)-Bestimmung von Sperma- spuren auf Baumwolle	17
d) Erhitzung der Spuren	18
e) UV-Bestrahlung der Spuren	19
f) Einwirkung von Feuchtigkeit in einer geschlossenen Kammer auf die Spuren	20
g) Behandlung der Spermaspur	21
III. <u>Ergebnisse</u>	
1. <u>Blutspuren auf Baumwolle, Wolle und Synthetik</u>	
a) Hitzeeinwirkung	22

	Seite
b) UV-Bestrahlung	26
c) Feuchtigkeitseinwirkung	27
2. <u>Spermaspuren auf Baumwolle</u>	
a) Hitzeeinwirkung	30
b) UV-Bestrahlung	33
c) Feuchtigkeitseinwirkung	35
3. <u>Ergänzende Untersuchungen</u>	37
IV. <u>Diskussion</u>	43
C. <u>Zusammenfassung</u>	51
D. <u>Literatur</u>	54

A. Einleitung

I. Immunglobuline und Allotypen der schweren und leichten Ketten

Seit TISELIUS die moderne Phase der Immunchemie durch Auftrennung der Serumproteine mittels der einfachen Elektrophorese einleitete, hat uns die Weiterentwicklung mit neuen Verfahren durch GRABAR und WILLIAMS, BUSSARD und PERRIN, GORDON, OUCHTERLONY, SCHEIDEGGER, SCHEURLIN und POULIK, PROKOP, LANG und NAUMANN (Lit. bei KÜHN) neue Kenntnisse über mehr als 200 Plasmaproteine gebracht.

Die vorliegende Arbeit betrifft die Immunglobuline. Zur Erklärung später erwähnter Befunde ist eine kurze Erläuterung der heutigen Vorstellungen über die Struktur der hier vor allem interessierenden Immunglobuline IgG und IgM erforderlich.

1964 schlug PORTER für das Immunglobulin IgG ein Modell vor, das in Y-Form zwei lange H-Ketten und zwei kürzere L-Ketten in symmetrischer Form vereinte. Spätere Strukturanalysen an Myelomproteinen konnten in Verbindung mit immunologischen Methoden ermitteln, daß die Fähigkeit der Immunglobuline zur Antikörperbindung auf das variable Segment beschränkt ist, das ein Viertel der Sequenz ausmacht. Für die Komplementbindung sind Strukturen des Fc-Fragmentes miterforderlich.

Es ist gesichert, daß das Immunglobulin G zwei symmetrische und identische Bindungsorte aufweist. Das aktive Zentrum dieses Bindungsortes soll nur etwa 20 Aminosäurereste umfassen.

Durch Untersuchungen an getrennten Ketten ergab sich, daß schwere und leichte Ketten zur Antikörperaktivität beitragen (EDELMANN), die schweren Ketten erwiesen sich aber fast immer als der aktivere Teil. Über die Bedeutung des Fc-Fragmentes ist wenig bekannt. Wahrscheinlich können Teile dieses Fragmentes mit Membrankomponenten der Zellen reagieren und die Permeation erleichtern. Hierbei soll der hauptsächlich im Fc-Fragment loka-

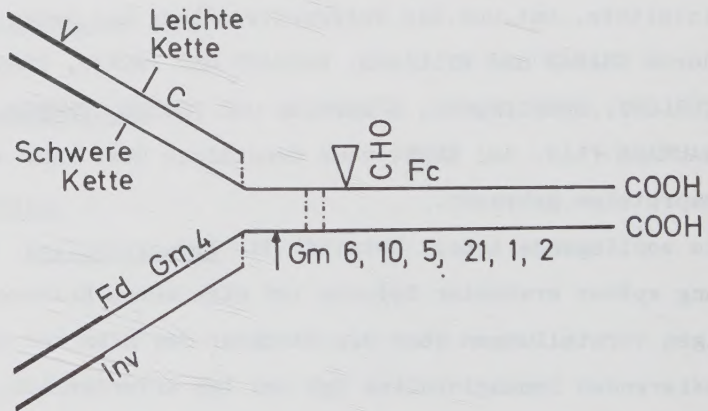


Abb. 1: Schematische Darstellung eines IgG-Moleküls und Lokalisation einiger allotypischer Merkmale auf den schweren und leichten Ketten (modifiziert nach EDELMANN und UHLENBRUCK)
V = variable Region, C = konstante Region,
Fd = Fd-Teil, Fc = Fc-Teil, CHO = Kohlenhydratanteil, Pfeil = Spaltung durch Papain, Keil = Spaltung durch Pepsin

lisierte Kohlenhydratanteil (2,4 - 2,9% bei IgG) beteiligt sein. Die Bedeutung des Kohlenhydratanteiles ist unzureichend erforscht. Der Fc-Teil wurde lange Zeit als konstant angesehen, bis man im Jahre 1956 durch Zufall allotypische Varianten entdeckte, die man in der Folge umfangreicher Untersuchungen als

Gm-Gruppen (Gammaketten-Marker) dem Fc-Teil der H-Ketten zugeordnete, z. B. Gm (1), Gm (2), Gm (5), Gm (10), Gm (21) oder als dem stabilen Fd-Teil zugehörig feststellte Gm (4).

1960 wurden aber auch an den leichten Ketten allotypische Spezifitäten beschrieben (ROPARTZ, RENOIR und RIVAT), die sich wahrscheinlich auf den Kappa-Typ der L-Kette beschränken und später mit Inv (1), (2), (3) bezeichnet wurden.

Die schematische Darstellung eines IgG-Moleküls zeigt Abb. 1.

Erhebliche strukturelle Unterschiede scheinen in den IgG-Subklassen zu bestehen.

Nach FRANGIONE und MILSTEIN enthalten IgG 1 und IgG 4-Moleküle vier "Zwischenkettenbindungen", zwei davon verbinden die schweren Ketten. IgG 3-Moleküle enthalten dagegen sieben "Zwischenkettenbindungen", von denen fünf Disulfidbindungen darstellen. Die leichten Ketten sind nur mit je einer Disulfidbrücke gebunden; die HL-Brücken sind hier nicht benachbart, was jedoch im IgG 1-Molekül der Fall ist. Dadurch ist das IgG 3-Molekül in seiner Beweglichkeit stärker eingeschränkt. Die IgG-Subklassen haben außerdem unterschiedliche Molekulargewichte.

Das Immunglobulin M ist ein Pentamer und der dominierende Antikörper des Neugeborenen. Obwohl es theoretisch dekavalent ist, da es aus fünf sternförmig angeordneten IgG-ähnlich gebauten Paaren von H- und L-Ketten besteht, scheint es aus sterischen Gründen meist pentavalent zu reagieren. Die Anti-Gm-Seren sind Kälteagglutinine, die der IgM-Fraktion angehören und erreichen ihre optimale Reaktionsfähigkeit bei Temperaturen unter 20°C.

II. Bisher vorliegende Befunde

Die von GRUBB und LAURELL 1956 entdeckte Eigenschaft einiger Normalseren, die Agglutination Rh-positiver mit inkompletten Anti-D-Seren beladener Erythrozyten durch den Rheumafaktor oder durch Kälteagglutinine zu hemmen, die als "Gm"-Eigenschaft bezeichnet wurde, erwies sich aufgrund ihres Polymorphismus als außerordentlich brauchbar. Das betraf nämlich nicht nur die Erforschung der Immunglobuline, sondern auch die Aufgaben der Identifizierung und der Abstammungsfeststellung. Für das Fach Rechtsmedizin waren von besonderem Vorteil das Vorkommen - außer im Blut - auch in Körpersekreten, die geringen, zum Nachweis erforderlichen Spuren Mengen und vor allem die erstaunliche Stabilität dieser Substanzen, so daß sie in die Routineuntersuchung der Blutspurenbestimmung Eingang fanden (Lit. bei SCHLEYER und OEPEL).

So fanden FÜNFFHAUSEN, SAGEN und SCHRAMM nach Lagerung von Blutspuren auf verschiedenen Spurenträgern bei Zimmertemperatur noch nach 12 Wochen eine unveränderte Hemmwirkung der Faktoren Gm (1) und Gm (2). Erhitzung von Blutproben im Trockenschrank (1 Stunde bei 120°C) hatte keinen Einfluß auf die Nachweisbarkeit von Gm (1), während die Erhitzung auf 150°C die Gm-Eigenschaft zerstörte. Bei Bestrahlung der Spuren mit ultraviolettem Licht (Hochdruckquarzbrenner U 500/ Abstand 50 cm) konnten die Faktoren Gm (1) und Gm (2) auch noch nach mehrstündiger Bestrahlung bestimmt werden. Auch bei dreistündiger Beschallung mit Ultraschall zeigten die Faktoren Gm (1) und Gm (2) keine Veränderung.

In Widerspruch zu diesen Ergebnissen stand die interessante Beobachtung von STEINBERG und STAUFFER, daß einige Gm-Faktoren nach Erhitzen auf 63°C (30 min) negativ wurden, wenn die Seren zuvor für einige Wochen bis Monate bei -20°C gelagert worden waren: einzelne Gm (1)- und Gm (2)-negative Seren wurden nach Erhitzen sogar Gm-positiv, und zwar nur dann, wenn das Serum nicht mit Kochsalz verdünnt wurde. Gm (2)-positive und Gm (5)-positive Seren erwiesen sich aber als stabil. Ein Gm (6)-negatives Serum wurde nach Erhitzen Gm-positiv. Die Veränderungen traten nur bei Seren auf, die beim Erhitzen ausflockten.

MERLI, RONCHI und MARCHIORI hatten im gleichen Jahr eine Arbeit veröffentlicht, die diese Ergebnisse bestätigte. Bei frischen Seren traten keine Veränderungen auf, wenn nicht mindestens 10 Minuten auf 140°C erhitzt wurde. Das bisher nur an erhitzten Seren untersuchte Inv (1)-Merkmal wurde durch Erhitzung bei 80°C (20 Minuten) nicht beeinträchtigt.

1965 berichteten LENOIR und MULLER, daß die sechswöchige Lagerung von Blutspuren auf verschiedenen Textilien in einem feuchten Keller ("cave humide") die Faktoren Gm (1), Gm (2) und Gm (5) negativ werden ließ. Eine Abschwächung der Eigenschaften trat schon nach 14 Tagen ein. Blutspuren, die im Laboratorium aufbewahrt wurden, zeigten keine Veränderung. Im dritten Monat traten allerdings nur bei Blutspuren auf Seide falsch-negative Resultate auf.

1974 wurde von GAARDER und NATVIG eine quantitative Untersuchung über die Agglutinationshemmung von Gm-positiven und Gm-negativen Nativseren und hitzeaggregierten Seren durchgeführt. Sie verwendeten Anti-Gm-Antiseren von Rheumatikern und von gesunden Spendern. Nach Erhitzung zeigten die Gm (1)-negativen

Seren eine gesteigerte Reaktionsfähigkeit mit den Testseren. Anti-Gm (1)-Antiseren von Rheumatikern reagierten mit aggregierten Gm -positiven Seren der IgG 1-, IgG 2- und IgG 3-Subklasse, aber nicht mit Gm (5)-positiven Seren oder Immunglobulinen der IgG 4-Subklasse. Auch Antiseren von Nicht-Rheumatikern zeigten dieses Verhalten, jedoch nur bei besonders hohen Immunglobulin-Konzentrationen.

III. Fragestellung

Die unter II geschilderten Untersuchungen wurden zum Teil an längere Zeit tiefgefrorenen Seren vorgenommen. Die Gültigkeit für auf Stoffen getrocknete Blut- und Sekretspuren, in denen eine Denaturierung sicher anders verläuft als in einem flüssigen Medium, war jedoch zweifelhaft. Auch gab der bei Verdünnung der erhitzten Seren mit physiologischer Kochsalzlösung dann doch mögliche Nachweis einige Rätsel auf.

Noch erstaunlicher schien die ausgeprägte Empfindlichkeit gegen Feuchtigkeit bei gleichzeitiger enormer Hitzetoleranz, die für Eiweißkörper einmalig ist. Auch die Unempfindlichkeit gegenüber UV-Bestrahlung ist in Anbetracht der bei Feuchtigkeitsexposition beobachteten Veränderungen unverständlich!

Um den sich aufdrängenden Fragen nachzugehen, war es erforderlich, die Hitzebeständigkeit der Gm-Faktoren für unterschiedliche Temperaturen zu klären sowie die zeitliche Abhängigkeit des Gm-Nachweises bei Feuchtigkeitsexposition und UV-Bestrahlung.

Außerdem schien eine entsprechende Untersuchung des Inv (1)-Merkmals angezeigt, weil die bisher veröffentlichten Untersu-

chungen einen Vergleich mit entsprechenden stärkeren Erhitzungen der Gm-positiven Seren nicht ermöglichen. Da sich ferner die bisher veröffentlichten Befunde auf die Faktoren Gm (1), (2), (5) und (6) sowie Inv (1) beschränken, war die zusätzliche Untersuchung der Faktoren Gm (4), (10) und (21) wünschenswert. Auf die Untersuchung des Faktors Gm (6) wurde verzichtet, weil er in Deutschland kaum vorkommt.

Es galt insbesondere nachzuprüfen, ob das von LENOIR und MUL-
LER beschriebene gleichsinnige Verhalten der Faktoren Gm (1),
Gm (2) und Gm (5) in Bezug auf ihre Nicht-Nachweisbarkeit durch
Einwirkung von Feuchtigkeit und Hitze aufrechterhalten werden
konnte. Dieses Verhalten war allein schon wegen der unterschied-
lichen Konzentration der Faktoren im Serum zweifelhaft, denn
Gm (1) und Gm (2) sind im Fc-Teil von IgG 1 lokalisiert, das
70-80% der IgG-Konzentration umfaßt, während Gm (5) auf dem Fc-
Teil von IgG 3 liegt, das nur 6-8% der IgG-Fraktion ausmacht.

Außerdem waren Untersuchungen an Sperma notwendig, zumal die
Voraussetzungen durch die Feststellung ausreichender IgG-Mengen
im Sperma und anderen Körpersekreten gegeben waren (BLENCK,
BRANDTZAEG und Mitarb., KLOSE und SCHRAVEN, NIELSEN und HENNING-
SEN, RÜMKE) und der Gm-Nachweis auf Spurenlägern ohne schädli-
gende Noxen gelungen war (JORCH und OEPEN, LEONHARDT und SCHLEYER,
SCHLEYER und OEPEN).

B. Eigene Untersuchungen

I. Material

a) Blut:

Nativblut von 30 gesunden Probanden wurde auf Baumwoll-, Woll- und Synthetiklappen (getragene Wäsche, normal gereinigt) aufgetragen. Die Blutflecken wurden dann bei Zimmertemperatur getrocknet und gelagert. Außerdem wurde von jedem Probanden für Kontrolluntersuchungen zusätzlich ein Röhrchen Blut entnommen und zentrifugiert; das Serum wurde abpipettiert und in verschlossenen Reagenzgläsern im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Nach Bestimmung der Gm-Faktoren und des Inv (1)-Faktors im Serum wurden acht Probanden mit unterschiedlichen Gm- und Inv-Mustern in die engere Wahl gezogen.

b) Sperma:

Die Spermaproben stammten ebenfalls von gesunden Probanden, deren Gm-Faktoren und Inv (1)-Reaktion vorher im Serum ermittelt wurden. Das frische Ejakulat wurde auf Baumwollstoff aufgetragen, die Fläche mit Kugelschreiber umrandet; die getrockneten Lappen wurden bei Zimmertemperatur gelagert.

II. Methode

Das Prinzip der Methode beruht auf dem Agglutinationstest. Es handelt sich um einen Coombstest, bei dem ein Unterabgang vorangestellt ist. Das hierbei verwendete Antiserum gegen humanes γ -Globulin-Serum ist spezifisch gegen bestimmte Antigene der Immunglobuline (Ig) gerichtet, die einen gewissen Polymorphismus aufweisen. Die Merkmale (Antigene) werden entsprechend ihrem Vorkommen in verschiedenen Ig-Klassen oder -Subklassen als G- und Inv-Faktoren bezeichnet.

Da die Reaktion des Antiserums mit einem solchen Merkmal auf den Gammaglobulinen eines unbekannten Serums unmittelbar bei der Mischung sowohl im Ouchterlony-Test als auch in der Immunelektrophorese nicht oder nur selten in Form von Präzipitaten sichtbar gemacht werden kann, wird ein Coombstest angeschlossen: wurde das Antiserum vorher durch das homologe Antigen abgetrennt, so reagiert es mit den mit inkompletten (IgG-)Antikörpern beladenen Erythrozyten nicht mehr reagieren. Im Falle einer positiven Reaktion wird also die Agglutination gemerkt. Das Auftreten einer Agglutination bedeutet hingegen, daß eine negative Reaktion vorliegt, weil das Antiserum im unbekannten Serum keinen korrespondierenden Reaktionspartner gefunden hat.

a) Gm- und Inv (1)-Bestimmung im Serum

Beladen der Testerythrozyten

5 ml Citratblut (1:10 verdünnt) von OD-positiven gesunden Spendern wurde am Untersuchungstag bei 3000 Upm. 5 min. zentrifugiert, das Plasma abpipettiert. Die Erythrozyten wurden dann dreimal in 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen.

Zum Beladen wurden folgende Testseren verwendet:

Anti-D-Gm (1)	(Molter)
Anti-D-Gm (2)	(Molter)
Anti-D-Gm (4)	(Molter)
Anti-D-Gm (5)	(Blutspendedienst SRK)
Anti-D-Gm (10)	(Molter)
Anti-D-Gm (21)	(Blutspendedienst SRK)
Anti-D-Inv (1)	(Molter)

Für die Faktorenbestimmung wurden im zweiten Teil des Untersuchungsganges die entsprechenden Antiseren (Anti-Gm (1), (2), (4), (5), (10), (21) und Anti-Inv (1)) derselben Firmen verwendet.

In beschriftete Röhrchen wurde gegeben:

0,1 ml Anti-D-Gm-Testserum,

0,2 ml NaCl (0,9%ig),

1 Tropfen gewaschenes Erythrozytensediment.

Die verschlossenen Röhrchen wurden zwei Stunden bei 37°C inkubiert, danach wurde 4mal in 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen und eine 1-5%ige Suspension hergestellt.

Bestimmung der Faktoren

Wegen ihrer besonderen Eignung wurden Plexiglasplättchen mit Stegen nach HENNIG und RACKWITZ verwendet.

Ein kleiner Tropfen des 1:10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Probandenserums wurde mit einem Tropfen des Antiserums (falls zu stark reagierend, in Verdünnung) vermischt und in einer feuchten Kammer 15 min inkubiert.

Um möglichst kleine Tropfen auftragen zu können, wurden Pasteur-Kapillar-Pipetten verwendet.

Dann wurde 1 Tropfen der beladenen Erythrozytensuspension zugegeben und verrührt; die Objektträger wurden anschließend 20 min im Kühlschrank bei 4⁰C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Als Kontrollen dienen:

- 1) Ansatz mit verdünntem Probandenserum, NaCl -Lösung (statt Antiserum) und Erythrozytensuspension.
- 2) Ansatz mit NaCl-Lösung (statt Probandenserum), Antiserum und Erythrozytensuspension.

Die Ergebnisse wurden bei starker Lupenvergrößerung und unter Bewegung der Objektträger abgelesen: Agglutination bedeutet, daß das bestimmte Merkmal nicht vorhanden ist, während die Hemmung der Agglutination die positive Reaktion anzeigt.

b) Gm-Bestimmung von Blutspuren
auf verschiedenen Spurenträgern

Zum Spurennachweis wurde die "Lösungsmethode" (FÜNFHAUSEN, SAGAN) gegenüber der "Absorptions-Methode" bevorzugt (SCHLEYER und OEPEN), da letztere mehr Antiserum benötigt und keine besseren Resultate gibt.

Nach Vorbehandlung wurden ca. 2 cm^2 einer Nativblutspur in quadratmillimetergroße Teilchen zerschnitten, in ein Reagenzglas gefüllt und soviel 0,9%ige NaCl zugegeben, daß sich ein geringer Überstand von ca. 4-6 Tropfen bildete, der nach der Inkubation abpipettiert und untersucht werden sollte.

Das verschlossene Reagenzglas wurde über Nacht in ein kühles Zimmer gestellt. Am nächsten Tag wurde die Untersuchung vorgenommen. Zunächst wurde der Ansatz 1 min mit einem Glasstab verrührt, um möglichst viel Substanz in Lösung zu bringen. Die weitere Untersuchung des Überstandes entsprach der Gm-Bestimmung im Serum; als zusätzliche Kontrollen wurden jedoch auch die unbehandelten Spurenträger einbezogen.

Da sich am unbehandelten Spurenträger nie unspezifische Agglutinationen oder Hemmungen zeigten, sind die Kontrollen in den nachfolgenden Tabellen nicht aufgeführt.

Bewußt wurde zunächst auf eine Verdünnung der als "gebrauchsfertig" gelieferten Gm-Antiseren verzichtet, da man davon ausgehen konnte, daß in den Spuren genügend Substrat vorhanden war. Im übrigen konnten die Parameter nach Bedarf im Laufe der Versuche noch verändert werden.

c) Gm- und Inv (1)-Bestimmung
von Spermaspuren auf Baumwolle

Es war ursprünglich geplant, Prostata-Exprimat zu verwenden. Nachdem die Untersuchung von 6 Prostata-Exprimaten wegen der geringen Substratmenge (ca. 2-4 Sekrettpfen) für eine Versuchsreihe zu gering war (JORCH benötigte für jeden Ansatz 4 cm^2 Spur), wurde ausschließlich frisches Ejakulat von gesunden Spendern verwendet. Hierbei war allerdings das Spenderangebot beschränkt.

Wie bei der Untersuchung der Blutspuren wurden die in quadratmillimetergroße Teilchen zerschnittenen Spureenträger, die allerdings im Gegensatz zu den Blutspuren 4 cm^2 groß waren, mit soviel physiologischer Kochsalzlösung versetzt, daß sich ein Überstand von ca. 4-6 Tropfen bildete.

Auch hier wurde das Antiserum nur in der von der Herstellerfirma empfohlenen Gebrauchsverdünnung verwendet. Dementsprechend wurden die Gm-Antiseren nicht, sondern nur das Anti-Inv (1)-Serum 1:10 verdünnt. Der Grund dafür war folgende Überlegung: Es ist bekannt, daß die Reaktion, von quantitativen Beziehungen zwischen den Faktoren und dem Antiserum abhängig ist (so auch JORCH und OEPE). Eine Reaktion tritt aber nicht nur bei optimaler Proportion, d. h. bei geringem Antigenüberschuß, ein, sondern auch noch bei Antikörperüberschuß. Erst ein erhebliches Mißverhältnis in den Molekularverhältnissen von Antigen und Antikörper bringt falsch-positive oder falsch-negative Resultate. Der gute Nachweis von Gm (1), Gm (2), Gm (4) und Gm (5) von JORCH sowie bei eigenen Voruntersuchungen an Sperma und Verwendung von Anti-

serum in geeigneter Gebrauchsverdünnung ließ ein entsprechendes Vorgehen bei allen Faktoren als sinnvoll erscheinen.

Aus Kostengründen und wegen der begrenzten Menge von Spermaproben wurden Spermaspuren nur auf Baumwolle untersucht. Der Einfluß des Spurenträgers wurde daher nur an Blutspuren geprüft.

d) Erhitzung der Spuren

Die Erhitzung der Spuren wurde bei 63°C begonnen, da STEINBERG und STAUFFER bei dieser Temperatur nach 30 min Veränderungen beobachtet hatten. Dazu wurden die Spuren in offenen Petrischalen in den Wärmeschrank gelegt; die genaue Einstellung des Thermostats wurde durch ein beigelegtes Thermometer ermittelt. Die übliche Kennzeichnung der Petrischalen erwies sich als unzweckmäßig, da die Beschriftung bei Temperaturen ab 130°C unleserlich wird. Deswegen wurden sie durch Einritzen in das Glas markiert. Die Spur auf Baumwollstoff wurde verschiedenen Temperaturen (85°C, 100°C, 120°C, 200°C) und bei den niedrigen Temperaturen auch unterschiedlichen Erhitzungszeiten ausgesetzt, um die zeitliche Abhängigkeit der Denaturierung der Spuren zu untersuchen und eine völlige Austrocknung zu gewährleisten. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, daß eine Konformationsänderung bzw. Denaturierung bei höheren Temperaturen wieder rückgängig gemacht wird, wie man es z. B. beim Bence-Jones-Protein findet, wurde die Erhitzung auch auf extreme Temperaturen (200°C) ausgedehnt. Bei Spuren auf Wolle und Synthetik wurde unter Berücksichtigung der Vorbefunde wegen der hohen Serumkosten so erhitzt, daß nur die Temperatur ermittelt wurde, bei der die ersten Veränderungen von Faktoren auftraten.

e) UV-Bestrahlung der Spuren

Zur UV-Bestrahlung wurden von FÜNFHAUSEN, SAGAN und SCHRAMM unphysiologisch hohe Bestrahlungen gewählt. Die Wirkung einer physiologischen Bestrahlung (Sonnenstrahlung) wäre forensisch-medizinisch interessant gewesen, konnte aber wegen der Jahreszeit und der ungünstigen Witterungsverhältnisse nicht untersucht werden. Aus diesen Gründen wurde von der ursprünglich geplanten "physiologischen Bestrahlung" Abstand genommen und eine im klinischen Bereich übliche UV-Strahlungsleuchte (Thorn As. 30.2, 220 V, 50 Hz, 30 Watt, davon 8 Watt UV-Strahlungsleistung = 83 u W / cm^2 , bezogen auf 100 cm Abstand) verwendet. Die technischen Daten der UV-Strahlungsleuchte sind nachstehend wiedergegeben.

Lampe: Thorn As.30.2 220 V 50 Hz
30 Watt, davon 8 Watt UV-Strahlungsleistung (83 u W / cm^2)
Daten auf 1 m Abstand bezogen

Spektrum:

8,7%	184,9 nm	UV-C (biologisch wichtige Strahlung)
78,5%	253,7 nm	
0,5%	296,8 nm	UV-B (Dorno-Strahlung)
0,3%	302,3 nm	
2,7%	312/13 nm	
2,1%	365/66 nm	UV-A
1,6%	404/7/407,8 nm	
3,7%	435,8 nm	
1,6%	546,1 nm	
0,3%	577,79 nm	

Der Abstand wurde während der Versuche auf 15 cm verkürzt, um die Intensität der Strahlung zu erhöhen

f) Einwirkung von Feuchtigkeit in
einer geschlossenen Kammer auf die Spuren

Um die Veränderbarkeit der zu untersuchenden Serumeigenschaften zu prüfen, wurden die Blutspuren in trockenen, flachen Plastikbechern in einer gemeinsamen feuchten Kammer (Boden mit feuchtem Fließpapier ausgelegt) der Feuchtigkeit bei normaler Zimmertemperatur ausgesetzt. Als nach 28 Tagen die feuchte Kammer geöffnet wurde, war auf sämtlichen Proben ein dichter Schimmelpilzrasen festzustellen.

Offensichtlich bot die Spur bei Zimmertemperatur und maximaler Feuchtigkeit optimale Bedingungen für das Wachstum der in geringen Mengen im Spurenläger oder der Luft enthaltenen Pilzsporen, so daß die Versuchsbedingungen ein alleiniges Einwirken von Feuchtigkeit unmöglich machten. Der Zusatz z. B. von Antimykotika hätte aber vermutlich die Bestimmung der Faktoren beeinflusst und war auch aus forensischer Sicht uninteressant, weil so vorbehandelte Spuren nie zu untersuchen sind. Da es auch nach einer Feuchtigkeitsexposition von sieben und fünf Tagen zu einem Pilzbefall kam, mußte die Expositionszeit auf drei Tage verkürzt werden, bei der dann noch kein Schimmelpilzrasen zu sehen war.

g) Behandlung der Spermaspur

Es wurde vermutet, daß der Nachweis der zu untersuchenden Faktoren im Sperma nach Einwirkung von Wärme, UV-Bestrahlung und Feuchtigkeit sehr viel schwieriger zu erbringen sein würde. Daher wurden die Expositionszeiten verkürzt. Leider verbrauchten die Untersuchungen der der Hitzeeinwirkung und UV-Bestrahlung ausgesetzten Proben soviel Spurensubstanz, daß die Untersuchung bei Feuchtigkeitsexposition nicht bis zur Veränderung vorher gut nachweisbarer Faktoren durchgeführt werden konnten.

III. Ergebnisse

1. Blutspuren auf Baumwolle, Wolle und Synthetik

a) Hitzeeinwirkung

In Tab. 1 sind die Untersuchungsergebnisse im Serum sowie an der unbehandelten Blutspur auf Baumwolle, Wolle und Synthetik dargestellt.

Nr.	Proband	Gm(1)	(2)	(4)	(5)	(10)	(21)	InV (1)
1.	Sch.	+	-	+	+	+	+	-
2.	Dre.	-	-	+	+	+	-	-
3.	Bec.	+	-	+	+	+	+	+
4.	Bie.	+	+	+	+	+	+	-
5.	Fra.	-	-	+	+	+	-	+
6.	Müh.	+	-	+	+	+	+	-
7.	Geo.	+	-	+	+	+	+	-
8.	Now.	+	-	-	-	-	+	-

Tab. 1. Typen der unbehandelten Seren und Spuren
+ = keine Agglutination (Hemmung = positive Reaktion)
- = Agglutination

Die Ergebnisse der Erhitzung von Blutspuren auf Baumwolle bei verschiedenen Temperaturen und Zeiten sind in Tab. 2, 3 und 4 zusammengefaßt. Daraus ergibt sich, daß die ersten falsch-negativen Veränderungen von Faktoren bei 85°C auftraten; am empfindlichsten war der Gm-Faktor (21), gefolgt von Gm (10), Gm (1).

und Inv (1). Bei einstündiger Erhitzung auf 120°C kam es zu falsch-negativen Veränderungen bei Gm (4), Gm (2) und Gm (1), bei dreistündiger Erhitzung zusätzlich zu Veränderungen von Gm (5). Hervorgehoben werden muß, daß trotz Erhitzung auf 200°C keine falsch-positiven Ergebnisse auftraten. Interessant war die Tatsache, daß die dreistündige Erhitzung auf 120°C 32 von 36 möglichen falsch-negativen Veränderungen brachte, während die stärkere Erhitzung auf 200°C nur 28 Faktorenveränderungen ergab.

Nr.	Proband	E r h i t z u n g a u f :							
		63 ^o C 1 h	63 ^o C 2 h	63 ^o C 12 h	85 ^o C 1 h	85 ^o C 24 h	120 ^o C 1 h	120 ^o C 3 h	200 ^o C 1 h
1.	Sch.	-	-	-	-	-	-	F	F
2.	Dre.	-	-	-	-	F	-	F	F
3.	Bec.	-	-	-	F	F	F	F	F
4.	Bie.	-	-	-	-	F	F	F	F
5.	Fra.	-	-	-	-	F	F	F	F
6.	Müh.	-	-	-	-	-	F	F	F
7.	Geo.	-	-	-	F	F	F	F	F
8.	Now.	-	-	-	-	-	F	F	F

Tab. 2. Nachweisbarkeit der Faktoren Gm (1), (2), (4), (5), (10), (21) und Inv (1) nach Erhitzung von Blutspuren auf Baumwolle
 - = alle Faktoren unverändert nachweisbar
 F = Veränderung von mindestens einem Faktor

Nr. Proband	Erhitzung auf:			
	85°C 1 h	85°C 24 h	120°C 1 h	120°C 3 h
1. Sch.				Gm (1), (10), (21) Gm (1), (10), (21)
2. Dre.		Gm (10)		Gm (4), (10) Gm (10)
3. Bec.	Gm (21)	Gm (1), (10), (21), Inv (1)	Gm (1), (4), (21), Inv (1)	Gm (1), (4), (10), (21) Inv (1)
4. Bie.		Gm (1), (10), (21)	Gm (1), (2), (4), (21)	Gm (1), (2), (4), (10), (21)
5. Fra.		Gm (10)	Gm (4), Inv (1)	Gm (4), (10), Inv (1)
6. Müh.			Gm (1), (21)	Gm (1), (4), (10), (21)
7. Geo.	Gm (21)	Gm (1), (10) (21)	Gm (1), (4), (21)	Gm (1), (4), (10), (21)
8. Now.			Gm (1), (21)	Gm (1), (21)

Tab. 3. Hitzetoleranz der Blutspuren auf Baumwolle und Faktorenänderung in Abhängigkeit vom Muster der Blutprobe sowie von Erhitzungsgrad und -dauer. Bei Veränderung von mindestens einem Merkmal wird der entsprechende Faktor aufgeführt

Gm (1) (2) (4) (5) (10) (21) Inv (1)

85°C	1 h					2	
85°C	24 h	3			5	3	1
120°C	1 h	5	1	4		5	2
120°C	3 h	6	1	6	3	7	2
200°C	1 h	6	1	5	1	7	2

Tab. 4. Zahl der in Tab. 3 angeführten Faktorenänderungen in Abhängigkeit von Erhitzungsgrad und -dauer

Bei der Erhitzung der Blutspuren auf Synthetik traten im Gegensatz zur Erhitzung der Spuren auf Baumwollstoff die ersten Veränderungen erst bei 120°C auf (siehe Tab. 5, 6, 7). Dieses Ergebnis war insofern erstaunlich, als die Erhitzung auf 85°C bei Baumwollstoff bereits Veränderungen bewirkt hatte. (Weitere Erörterungen siehe unter IV.)

Nr.	Proband	1 h 120°C	3 h 120°C
1.	Sch.	Gm (5)(10)(21)	Gm (4)(5)(10)(21)
5.	Fra.	Gm (5)(10)	Gm (5)(10) Inv(1)
7.	Geo.	Gm (1)(4)(5)(10)	Gm (1)(4)(5)(10)(21)
8.	Now.	Gm (21)	Gm (21)

Tab. 5. Hitzetoleranz der Blutspuren auf Synthetik und Faktorenänderung in Abhängigkeit von Erhitzungsgrad und -dauer, sonst wie Tab. 3

Nr.	Gm (1) (2) (4) (5) (10) (21) Inv (1)
1 h 120°C	1 - 1 3 2 2 -
3 h 120°C	1 - 1 3 3 3 1

Tab. 6. Zahl der in Tab. 5 aufgeführten Faktorenänderungen in Abhängigkeit von Erhitzungsgrad und -dauer

Die Blutspur auf Wolle zeigte bei Erhitzung auf 120°C nur eine Faktorenveränderung (Inv (1)). Wolle erwies sich also als "zuverlässigster" Spureenträger.

b) UV-Bestrahlung

Die Veränderungen durch UV-Bestrahlung sind in Tab. 7, 8 und 9 wiedergegeben. Die ersten Veränderungen tragen nach 24stündiger UV-Bestrahlung auf, wobei sich der Faktor Gm (21) als der empfindlichste erwies. Nach 48stündiger Bestrahlung ergaben sich Faktorenänderungen bei Gm (10), Gm (1) und Inv (1), bei 120stündiger Bestrahlung wurde auch der Faktor Gm (5) beeinträchtigt. Die Zahl der insgesamt veränderten Faktoren nahm mit der Bestrahlungsdauer zu.

Nr.	Proband	Dauer der UV-Bestrahlung		
		24 h	48 h	120 h
1.	Sch.	-	-	-
2.	Dre.	-	F	F
3.	Bec.	-	F	F
4.	Bie.	-	F	F
5.	Fra.	-	F	F
6.	Müh.	-	F	F
7.	Geo.	F	F	F
8.	Now.	-	F	F

Tab. 7. Nachweisbarkeit der Gm-Faktoren und des Inv (1)-Faktors nach UV-Bestrahlung von Blutspuren auf Baumwolle in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer. Symbole siehe Tab. 2

Nr.	Proband	UV-Bestrahlung		
		24 h	48 h	120 h
1.	Sch.			
2.	Dre.		Gm (10)	Gm (5), (10)
3.	Bec.		Gm (1), (10), (21), Inv. (1)	Gm (5), (10), (21), Inv (1)
4.	Bie.		Gm (1), (10), (21)	Gm (1), (5), (10), (21)
5.	Fra.		Gm (1)	Gm (10)
6.	Müh.		Gm (10), (21)	Gm (10), (21)
7.	Geo.	Gm (21)	Gm (1), (10), (21)	Gm (5), (10)
8.	Now.		Gm (21)	Gm (21)

Tab. 8. UV-Bestrahlung der Blutspuren auf Baumwollstoff und Abhängigkeit der Faktorenänderung vom Muster der Blutprobe und von der Bestrahlungsdauer. Bei Veränderung von mindestens einem Faktor wird der entsprechende Faktor aufgeführt. (Keine falsch-positiven Ergebnisse)

	Gm	(1)	(2)	(4)	(5)	(10)	(21)	Inv	(1)
UV-Bestrahlung									
24 h							1		
48 h		3	1			6	5		1
130 h		1			4	6	6		1

Tab. 9. Zahl der in Tab. 8 erwähnten Faktorenänderungen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer

c) Feuchtigkeitseinwirkung

Bei Feuchtigkeitseinwirkung zeigte sich im Gegensatz zu den Veränderungen bei Erhitzung und Bestrahlung ein völlig differentes Verhalten der untersuchten Faktoren (siehe Tab. 10, 11 und 12).

Nr.	Proband	Gm	(1)	(2)	(4)	(5)	(10)	(21)	Inv (1)
1.	Sch.		+	-	+	+	(-)	(-)	-
2.	Dre.		-	-	+	+	+	-	-
3.	Bec.		+	-	+	+	+	+	+
4.	Bie.		+	+	+	+	+	+	-
5.	Fra.		-	-	+	+	+	-	(-)
6.	Müh.		+	-	+	+	+	+	+
7.	Geo.		(-)	-	(-)	+	(-)	(-)	-
8.	Now.		(-)	-	-	[+]	-	(-)	-

Tab. 10. Faktorennachweis nach fünftägiger Feuchtigkeits-
 exposition an Blutspuren mit Pilzbefall
 + Fehlen der Agglutination = positive Reaktion
 - Agglutination = negative Reaktion
 () Aufhebung einer zu erwartenden positiven
 Reaktion = falsch-negative Reaktion
 [] Aufhebung einer zu erwartenden Agglutination
 = falsch-positive Reaktion

Nr.	Proband	Gm	(1)	(2)	(4)	(5)	(10)	(21)	Inv (1)
1.	Sch.		+	-	+	+	+	+	-
2.	Dre.		-	[+]	+	+	+	-	-
3.	Bec.		+	-	+	+	+	(-)	+
4.	Bie.		+	+	+	(-)	+	(-)	-
5.	Fra.		-	[+]	+	+	(-)	-	+
6.	Müh.		+	-	+	+	+	(-)	-
7.	Geo.		+	-	+	+	+	(-)	-
8.	Now.		+	(-)	-	-	-	(-)	-

Tab. 11. Faktorennachweis nach siebentägiger Feuchtigkeits-
 exposition (mit Pilzbefall) von Blutspuren auf
 Baumwollstoff

Nr.	Proband	Gm (1)	(2)	(4)	(5)	(10)	(21)	Inv (1)
1.	Sch.	-	-	-	-	-	-	-
2.	Dre.	-	-	-	-	-	-	-
3.	Bec.	-	-	-	-	-	-	-
4.	Bie	-	-	+	-	-	-	-
5.	Fra.	-	-	-	-	-	-	-
6.	Müh.	-	-	+	-	-	-	-
7.	Geo.	-	-	-	-	-	-	-
8.	Now.	+	-	-	-	-	-	-

Tab. 12. Faktorennachweis nach 28tägiger Feuchtigkeitsexposition (mit Pilzbefall) von Blutspuren auf Baumwollstoff. Ablesung nach 30minütiger Inkubation

+ = Keine Agglutination = positive Reaktion

- = Agglutination = negative Reaktion

Während sich nach fünftägiger Feuchtigkeitseinwirkung Veränderungen bei Gm (1), Gm (4), Gm (5), Gm (10), Gm (21) und Inv (1) zeigten, fanden sich bei siebentägiger Feuchtigkeitseinwirkung Veränderungen bei Gm (2), Gm (5), Gm (10) und Gm (21). Am empfindlichsten erwies sich der Gm-Faktor (21). Die Diskrepanz der Befunde von Tab. 10 und 11 beruht wahrscheinlich auf unterschiedlichem Schimmelpilzbefall, der an verschiedenen Farben und Wuchsformen bei Lupenvergrößerung erkennbar war.

Offensichtlich hatten die heterotrophen Schimmelpilze mittels Exopeptidasen und Glykosidasen die Immunglobuline verändert. Hervorgehoben werden muß, daß es bei Gm (2) zweimal und Gm (5) einmal zu falsch-positiven Ergebnissen kam. Bei 28tägiger Feuchtigkeitsexposition waren nach 30minütiger Inkubation nur noch drei Agglutinationshemmungen nachweisbar. Als nach

2 Stunden erneut kontrolliert wurde, fanden sich bei den in Tab. 12 aufgeführten Gm-positiven Proben doch schwache Agglutinationen. Auf dieses Problem der "Spättagglutination" wird später noch eingegangen.

Es war von Interesse, ob sich im Eluat der mit Schimmelpilz befallenen Blutspuren pH-Veränderungen und Änderungen der Glukose- und Eiweißkonzentration nachweisen ließen. Die Untersuchungen mit Combistix-Teststäbchen zeigten tatsächlich eine Ansäuerung des pH-Wertes auf pH 6 und eine stärkere Glukosekonzentration im Eluat der pilzbefallenen Spur als im ursprünglichen Medium. Die Acetonprobe war positiv.

Da es denkbar war, daß bei den Gm-positiv gewordenen Proben der Schimmelpilz selbst eine Agglutinationshemmung herbeigeführt hatte, wurde der vorsichtig abgeschabte Schimmelpilz dieser Proben auf seine Gm-Eigenschaften untersucht. Agglutinationshemmungen konnten in keinen Fall beobachtet werden. Auch unspezifische Hemmungen durch den Spureenträger waren nicht aufgetreten.

2. Spermaspuren auf Baumwolle

a) Hitzeeinwirkung

Vor Beginn der Spurenuntersuchung wurden die Faktoren der Probanden am 1:10 verdünnten Serum bestimmt (siehe Tab. 13). Leider standen keine Gm-negativen Probanden der Faktoren Gm (4), Gm (5) und Gm (10) zur Verfügung. Die Untersuchungsergebnisse der unbehandelten Spermaspuren auf Baumwollstoff zeigt Tab. 14. Daraus geht hervor, daß Gm (10) in keinem Fall, Gm (21) und Inv (1) nicht sicher nachweisbar waren.

Nr. Proband Gm (1) (2) (4) (5) (10) (21) Inv (1)

1.	Dre.	-	-	+	+	+	-	-
2.	Fra.	-	-	+	+	+	-	+
3.	Pet.	-	-	+	+	+	-	+
4.	Geo.	+	-	+	+	+	+	-
5.	Fri.	-	-	+	+	+	-	+
6.	Sch.	+	-	+	+	+	+	-

Tab. 13. Faktorenbestimmung von 1:10 verdünntem Serum mit Antiserum in Gebrauchsverdünnung (siehe Tab. 12)

+ = Keine Agglutination = positive Reaktion
- = Agglutination = negative Reaktion

Nr. Proband Gm (1) (2) (4) (5) (10) (21) Inv (1) (1:10)

1.	Dre.	-	-	+	+	(-)	-	-
2.	Fra.	-	-	+	+	(-)	-	+
3.	Pet.	-	-	+	+	(-)	-	+
4.	Geo.	+	-	+	+	(-)	(-)	-
5.	Fri.	-	-	+	+	(-)	-	(-)
6.	Sch.	+	-	+	+	(-)	+	-

Tab. 14. Faktorenbestimmung von unbehandelten Spermaspuren auf Baumwollstoff (4 cm²)

+ = Keine Agglutination
() = Faktorennachweis nicht möglich = falsch-negativer Befund
- = Agglutination

Wie bereits in Kapitel B I g erwähnt, wurde dieses Ergebnis vorläufig hingenommen, zumal JORCH und OEPEN ebenfalls nicht immer den Gm-Faktor (21) und die Inv (1)-Eigenschaft nachweisen konnten. Da vermutet wurde, daß bei Erhitzung der Spermaspur der Faktorennachweis sehr schwierig sein würde, wurden die Tem-

peraturen niedrig angesetzt, und es wurde nur die Erhitzungsdauer variiert.

Aus Tab. 15, 16, 17 ist zu entnehmen, daß die vorher gut nachweisbaren Faktoren unbeeinträchtigt blieben, bei den Faktoren Gm (10), Gm (21) und Inv (1) zeigte sich keine nennenswerte Änderung, abgesehen von der erstaunlichen Tatsache, daß sich einige vorher nicht nachweisbare Faktoren später doch als nachweisbar erwiesen.

Nr.	Proband	Gm (1)	(2)	(4)	(5)	(10)	(21)	Inv (1)
1.	Dre.	-	-	+	+	(-)	-	-
2.	Fra.	-	-	+	+	(-)	-	(-)
3.	Pet.	-	-	+	+	(-)	-	+
4.	Geo.	+	-	+	+	(-)	(-)	-
5.	Fri.	-	-	+	+	(-)	-	(-)
6.	Sch.	+	-	+	+	(-)	(-)	-

Tab. 15. Faktorennachweis bei Erhitzung von Spermaspuren auf Baumwollstoff, Temperatur 63°C, Dauer 1 h
 + = Keine Agglutination
 - = Agglutination
 () = Faktorennachweis nicht möglich

Nr. Proband Gm (1) (2) (4) (5) (10) (21) Inv (1)

1.	Dre.	-	-	+	+	(-)	-	-
2.	Fra.	-	-	+	+	(-)	-	+
3.	Pet.	-	-	+	+	+	-	+
4.	Geo.	+	-	+	+	(-)	(-)	-
5.	Fri.	-	-	+	+	(-)	-	+
6.	Sch.	+	-	+	+	(-)	+	-

Tab. 16. Faktorennachweis bei Erhitzung von Spermaspuren auf Baumwollstoff, Temperatur 63°C, Dauer 2 h
 + = Keine Agglutination
 - = Agglutination
 () = Faktorennachweis nicht möglich

Nr. Proband Gm (1) (2) (4) (5) (10) (21) Inv (1)

1.	Dre.	-	-	+	+	(-)	-	-
2.	Fra.	-	-	+	+	(-)	-	+
3.	Pet.	-	-	+	+	+	-	+
4.	Geo.	+	-	+	+	(-)	(-)	-
5.	Fri.	-	-	+	+	(-)	-	(-)
6.	Sch.	+	-	+	+	(-)	(-)	-

Tab. 17. Faktorennachweis bei Erhitzung von Spermaspuren auf Baumwolle, Temperatur 63°C, Dauer 5 h
 + = Keine Agglutination
 - = Agglutination
 () = Faktorennachweis nicht möglich

b) UV-Bestrahlung

Das Ergebnis der UV-Bestrahlung zeigen die Tab. 18, 19 und 20. Daraus geht hervor, daß die ersten Veränderungen bei zwölfstündiger Bestrahlung auftraten. Dabei kam es zu falsch-negativen Ergebnissen bei den Faktoren Gm (1) und Gm (5). Gm (10) und

Gm (21) waren in keinem Fall nachweisbar, während der Inv (1)-Nachweis bei zwei Proben gelang. Es ergab sich somit ein ähnliches Verhalten der Spermaspuren, wie es bereits bei der Bestrahlung der Blutspuren festgestellt worden war. Demnach scheinen die Faktoren Gm (4) und Inv (1) weniger empfindlich gegenüber UV-Bestrahlung zu sein als die übrigen untersuchten Faktoren.

Nr.	Proband	Gm (1)	(2)	(4)	(5)	(10)	(21)	Inv (1)
1.	Dre.	-	-	+	+	(-)	-	-
2.	Fra.	-	-	+	+	(-)	-	+
3.	Pet.	-	-	+	+	+	-	-
4.	Geo.	+	-	+	+	(-)	(-)	(-)
5.	Fri.	-	-	+	+	(-)	-	(-)
5.	Sch.	+	-	+	+	(-)	(-)	-

Tab. 18. Faktorennachweis nach UV-Bestrahlung von Spermaspuren auf Baumwolle, Dauer 1 h
 + = Keine Agglutination
 - = Agglutination
 () = Faktorennachweis nicht möglich

Nr.	Proband	Gm (1)	(2)	(4)	(5)	(10)	(21)	Inv (1)
1.	Dre.	-	-	+	+	(-)	-	-
2.	Fra.	-	-	+	+	(-)	-	(-)
3.	Pet.	-	-	+	+	+	-	+
4.	Geo.	+	-	+	+	(-)	(-)	-
5.	Fri.	-	-	+	+	(-)	-	+
6.	Sch.	+	-	+	+	(-)	(-)	-

Tab. 19. Faktorennachweis nach UV-Bestrahlung von Spermaspuren auf Baumwolle, Dauer 5 h
 + = Keine Agglutination
 - = Agglutination
 () = Faktorennachweis nicht möglich

Nr.	Proband	Gm	(1)	(2)	(4)	(5)	(10)	(21)	Inv	(1)
1.	Dre.	-	-	+	(-)	(-)	-	-		
2.	Fra.	-	-	+	(-)	(-)	-	+		
3.	Pet.	-	-	+	+	(-)	-	+		
4.	Geo.	(-)	-	+	(-)	(-)	(-)	-		
5.	Fri.	-	-	+	(-)	(-)	-	(-)		
6.	Sch.	+	-	+	(-)	(-)	(-)	-		

Tab. 20. Faktorennachweis nach UV-Bestrahlung von Sperma-
spuren auf Baumwolle, Dauer 12 h
+ = Keine Agglutination
- = Agglutination
() = Faktorennachweis nicht möglich

c) Feuchtigkeitseinwirkung

In Tab. 21 und 22 sind die Ergebnisse der Feuchtigkeitsexposition wiedergegeben. Daraus ergibt sich, daß die Spuren durch eine zweitägige Exposition unbeeinträchtigt blieben. Weitere Untersuchungen waren leider nicht mehr möglich, da die Spuren zum Teil verbraucht oder für ergänzende Untersuchungen benötigt wurden. Allerdings wurde von Proband Fri. eine Spur über 40 Tage in der feuchten Kammer gehalten, ohne daß Schimmelpilzbefall beobachtet werden konnte. Offenbar enthält Sperma fungizide Substanzen oder bietet den Pilzen zu wenig geeignetes Substrat, um ein Wachstum zu ermöglichen.

Nr.	Proband	Gm	(1)	(2)	(4)	(5)	(10)	(21)	Inv	(1)
1.	Dre.	-	-	+	+	(-)	-	-		
2.	Fra.	-	-	+	+	(-)	-	+		
3.	Pet.	-	-	+	+	(-)	-	+		
4.	Geo.	+	-	+	+	(-)	(-)	-		
5.	Fri.	-	-	+	+	(-)	-	(-)		
6.	Sch.	+	-	+	+	(-)	+	-		

Tab. 21. Feuchte Kammer, Spurennachweis von Spermaspuren auf Baumwollstoff nach eintägiger Exposition nach Reaktion mit Antiserum in Gebrauchsverdünnung
 + = Keine Agglutination
 - = Agglutination
 () = Faktorennachweis nicht möglich

Nr.	Proband	Gm	(1)	(2)	(4)	(5)	(10)	(21)	Inv	(1)
1.	Dre.	-	-	+	+	(-)	-	-		
2.	Fra.	-	-	+	+	(-)	-	(-)		
3.	Pet.	-	-	+	+	+	-	(-)		
4.	Geo.	+	-	+	+	(-)	(-)	-		
5.	Fri.	-	-	+	+	(-)	-	+		
6.	Sch.	+	-	+	+	(-)	(-)	-		

Tab. 22. Feuchte Kammer, Spurennachweis von Spermaspuren auf Baumwollstoff nach 2tägiger Exposition nach Reaktion mit Antiserum in Gebrauchsverdünnung
 + = Keine Agglutination
 - = Agglutination
 () = Faktorennachweis nicht möglich

3. Ergänzende Untersuchungen

Wie bereits erwähnt (siehe Kapitel I g), war selbst bei un-
behandelten Spermaspuren der Nachweis der Faktoren Gm (10), (21)
und Inv (1) nicht immer möglich gewesen. Eventuell hatte das im
Überschuß vorliegende Antiserum nicht oder nicht genügend von
den in geringen Mengen vorliegenden agglutinationshemmenden Sub-
stanzen gebunden werden können, so daß beladene Erythrozyten ag-
glutiniert werden konnten. Auch an eine unspezifische Substrat-
hemmung durch Substratüberschuß, eine Beeinflussung durch Visko-
sität des nativen Spermas oder an ein Prozonenphänomen, wie es
bei Anti-D-Testseren im Überschuß gelegentlich auftritt, war zu
denken.

Zur weiteren Klärung wurde eine Verdünnungsreihe eines Gm (10)-
positiven Spermas in einer Verdünnung 1:1 bis 1:2048 mit dem un-
verdünnten Antiserum Gm (10) zur Reaktion gebracht. In sämtli-
chen Verdünnungsstufen trat nach Zugabe von beladenen Erythrozy-
ten eine Agglutination auf, obwohl eine Agglutinationshemmung
zu erwarten war. Somit spielte eine Substrathemmung durch einen
Überschuß an Gm-Substanz keine Rolle. Durch die Verdünnung war
die Viskosität verringert worden und hatte somit das Ergebnis
nicht beeinflußt. Um die Frage zu klären, ob nichtgebundenes
Antiserum für die falsch-negativen Ergebnisse verantwortlich war,
wurde eine Verdünnungsreihe des Antiserums Gm (10) mit unbehan-
deltem, unverdünntem flüssigen Sperma zur Reaktion gebracht
(siehe Tab. 23).

Proband Fra.				Reaktion		
Sperma	Fra.	+	Antiserum Gm (10)	1 :	10	+
"	"	+	"	1 :	20	+
"	"	+	"	1 :	40	+
"	"	+	"	1 :	80	(+)
"	"	+	"	1 :	160	-
"	"	+	"	1 :	320	-
"	"	+	"	1 :	640	-
"	"	+	"	1 :	1280	-

Tab. 23. Reaktion des unverdünnten Spermas Fra. mit einer Verdünnungsreihe des Antiserums Anti-Gm (10)
 + = Agglutination nach Prüfung mit beladenen Erythrozyten
 - = keine Agglutination

Die Kontrolle (beladene Erythrozyten + Antiserum Gm (10) 1:160) zeigte eine Agglutination, somit war eine Agglutinationshemmung durch die Spermaproben ebenso bewiesen wie die Notwendigkeit, das Antiserum in kritischer Verdünnungsstufe zu verwenden.

Nachdem so die Nachweisbarkeit der Gm-Eigenschaft (10) im Sperma gesichert war, wurden die kritischen Verdünnungsstufen der Antiseren Gm (21) und Inv (1) ermittelt. Es zeigte sich, daß an den unbehandelten Spermaspuren mit den in kritischer Verdünnung verwendeten Antiseren nunmehr alle vorher nicht nachweisbaren Faktoren ermittelt werden konnten. Dies traf auch für die unbehandelten Spuren auf Baumwolle zu. Allerdings mußte die Verdünnung der Spuren durch physiologische Kochsalzlösung durch die Elution während der Vorbehandlung mitberücksichtigt werden.

Eine weitere unbeantwortete Frage war, ob die bei den Vor-

untersuchungen durch Einwirkung von Hitze aufgetretenen Faktorenänderungen Ausdruck einer reversiblen oder irreversiblen Denaturierung der Immunglobuline waren, oder ob eine Adsorption der Spuren an die Textilfasern bei der anschließenden Untersuchung einen Substratmangel bedingt hatte und eine Verwendung des Antiserums in entsprechender Verdünnung erfordert hätte. Da bei den Voruntersuchungen bei Erhitzung von Vollblut ein penetranter Geruch bei Temperaturen von 120°C und 200°C aufgefallen war, der bei 200°C intensiver war, und das Eluat als Hinweis auf eine Zerstörung des Hämoglobins nur schwach rötlich gefärbt war, war eine Denaturierung bei höheren Temperaturen anzunehmen. Die Erhitzung der Spermaspur auf 63°C hatte jedoch, wie Nachuntersuchungen mit Antiserum in kritischer Verdünnung ergaben, keine Faktorenänderung bewirkt. Aus diesem Grunde wurden zusätzliche einstündige Erhitzungen von Spermaspuren auf Baumwolle bei 85°C, 120°C und 160°C vorgenommen (siehe Tab. 24).

Nr.	Proband	Gm	(1)	(2)	(4)	(5)	(10)	(21)	Inv (1)
							1:20	1:20	1:20
1.	Dre.	-	-	+	+	+	-	-	-
2.	Fra.	-	-	+	+	+	-	+	+
3.	Pet.	-	-	+	+	+	-	+	+
4.	Geo.	+	-	+	+	+	+	-	-
5.	Fri.	-	-	+	+	+	-	+	+
6.	Sch.	+	-	+	+	+	+	-	-

Tab. 24. Nachweis der Gm-Faktoren und des Inv (1)-Faktors nach Erhitzung von Spermaspuren auf Baumwollstoff (85°C 1 h und 120°C 1 h)
 + = Keine Agglutination
 - = Agglutination

Die Tabelle zeigt, daß in sämtlichen Fällen der Nachweis der Faktoren gelang. Auch bei Erhitzung auf 120°C waren alle Faktoren nachweisbar.

Das Ergebnis der Erhitzung auf 160°C zeigt Tab. 25.

Nr. Proband	Gm (1)	(2)	(4)	(5)	(10)	(21)	Inv (1)		
	1:20	1:20	1:10	1:10	1:20	1:20	1:40/	1:20/	1:10
1. Dre.	nicht geprüft								
2. Fra.	+	+	+	+	+	+	+		
3. Pet.	+	+	+	+	+	+	+		
4. Geo.	-	+	+	+	+	+	+		
5. Fri.	+	+	+	+	+	+	+		
6. Sch.	+	+	+	+	+	+	+		

Tab. 25. Reaktion der bei 160°C 1 h erhitzten Spermaspuren auf Baumwollstoff nach einstündiger Inkubation im Kühlschrank und einstündiger Reaktion mit beladenen Erythrozyten
 + = Agglutination
 - = keine Agglutination

Bis auf eine Ausnahme waren in allen Proben Agglutinationen, d. h. negative Reaktionen aufgetreten. Weder eine Verdoppelung der Spurenmenge noch eine stärkere Verdünnung der Antiseren unter Berücksichtigung der bei Verdünnung des Antiserums noch erforderlichen Agglutinationsfähigkeit bei der Kontrolle konnten den Faktorennachweis sichern.

Um weitere Informationen über quantitative Korrelationen der untersuchten Blutspuren zu erhalten, wurde ein Serummischpool der Probanden 1-8 in Verdünnungsreihen untersucht (Tab. 26).

Pool	Gm	(1)	(2)	(4)	(5)	(10)	(21)	Inv	(1)
Pool 1-8 unverdünnt	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool 1-8 1:1 verd.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool 1-8 1:2 verd.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool 1-8 1:4 verd.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool 1-8 1:8 verd.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pool 1-8 1:16 verd.	-	-	-	-	+	-	-	+	+
Pool 1-8 1:32 verd.	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Tab. 26. Verdünnungsreihen eines Serummischpools der Probanden 1-8 (siehe Tab. 1) unter Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung und Reaktion mit Antiseren in Gebrauchsverdünnung
 + = Keine Agglutination
 - = Agglutination

Daraus geht hervor, daß zuerst die Faktoren Gm (10) und Inv (1) nicht mehr nachweisbar waren, und zwar schon bei einer Poolverdünnung von 1:16, danach folgte der Gm-Faktor (21). Die Nachweisempfindlichkeit ist aber nur scheinbar so gering, weil die Herstellung des Pools selbst eine Verdünnung der agglutinationshemmenden Faktoren bewirkte, um so mehr, je weniger Gm-positive Faktoren eines Allotyps vorhanden waren. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache ergeben sich folgende Verdünnungsstufen (siehe Tab. 27), bezogen auf Poolverdünnung 1:16.

Gm	(1)	(2)	(4)	(5)	(10)	(21)	Inv (1)
	$\frac{1}{85}$	$\frac{1}{512}$	$\frac{1}{149}$	$\frac{1}{149}$	$\frac{1}{149}$	$\frac{1}{102}$	$\frac{1}{256}$

Tab. 27

Der Einfachheit halber wurde hier allerdings fälschlich vorausgesetzt, daß bei allen Gm-positiven Seren gleiche Faktorenkonzentrationen vorliegen. Auf dieses Problem wird in Abschnitt IV in der Diskussion noch eingegangen.

Ergänzend wurde eine Verdünnungsreihe eines handelsüblichen lyophilisierten Human-Gammaglobulinpräparates in einer Verdünnung von 1:2 bis 1:512 untersucht (siehe Tab. 28).

	Gm	(1)	(2)	(4)	(5)	(10)	(21)	Inv(1)
Ein Tropfen einer Probe								
1. Intraglobin 500 mg in 10 ml Aqua dest gelöst	-	-	-	(+)	-	-	-	-
2. Verdünnung 1 : 2	-	-	-	(+)	(+)	-	-	-
3. Verdünnung 1 : 4	-	-	-	(+)	(+)	(+)	-	-
4. Verdünnung 1 : 8	-	-	-	(+)	(+)	+	-	-
5. Verdünnung 1 : 16	-	-	-	(+)	+	+	-	-
6. Verdünnung 1 : 32	-	-	-	(+)	+	+	-	-
7. Verdünnung 1 : 64	-	(+)	-	+	++	++	-	-
8. Verdünnung 1 : 128	-	(+)	-	+	++	++	-	-
9. Verdünnung 1 : 512	(+)	+	-	+	++	++	+	+

Tab. 28. Verdünnungsreihe von Human-Gammaglobulin (Intraglobin) und Reaktion mit Antiserum in Gebrauchsverdünnung (nach Vorschrift der Herstellerfirma). 1 Flasche mit 795 mg Trockensubstanz (lyophilisiert), enthaltend 500 mg Human-Gammaglobulin, wurde mit 10 ml Aqua dest. verdünnt
 + = Agglutination
 - = Keine Agglutination
 () = eine abgeschwächte Agglutination

IV. Diskussion

Aufgabe der vorliegenden Untersuchung war, die Veränderbarkeit der Gm-Faktoren und des Inv (1)-Faktors in Blut- und Spermaspuren in Abhängigkeit von forensisch-medizinisch relevanten denaturierenden Einflüssen zu untersuchen. Entgegen der Erwartung kam es sowohl zu falsch-negativen als auch falsch-positiven Befunden.

Hierfür sind folgende Vorgänge als Ursache denkbar: Bei Erhitzung und UV-Bestrahlung gilt als gemeinsames Wirkungsprinzip die Proteindenaturierung. Bei Hitzeeinwirkung kommt es nicht nur zum Aufbrechen von Wasserstoffbindungen und hydrophoben Bindungen, sondern auch zur Disulfidbrückensprengung. Daraus resultiert eine Veränderung der Tertiärstruktur durch Entfaltung der Peptidketten, die Dipoleigenschaften der Immunglobuline werden verändert, es kommt durch Eingehen von neuen Bindungen (Zufallsknäuel) zu einer neuen Tertiärstruktur, die Abschwächung vorhandener Eigenschaften oder differente Eigenschaften des Moleküls zur Folge haben kann. So kann es auch zu Reaktionen zwischen den Molekülen kommen, die durch Aggregation als sichtbarer Niederschlag ausfallen können. Ebenso können sich die Antigeneigenschaften ändern. Bei der Hitzedenaturierung muß zwischen reversiblen und irreversiblen Veränderungen unterschieden werden. Reversible Hitzedenaturierung führt nicht zu einer völligen Aufhebung der Konformation (LÜBKE und Mitarb., RAPOPORT).

Energiereiche UV-Strahlung kann durch Bildung von Radikalen ($H^{\bullet}$, $OH^{\bullet}$ etc.) und Peroxyden (HO_2 , H_2O_2) selbst kovalente Bindungen lösen (RAPOPORT). Diese Veränderungen sind ebenfalls zum

Teil reversibel, die Wiederherstellung kann jedoch längere Zeit beanspruchen (LÜBKE und Mitarb., RAPOPORT).

Obwohl also Hitzeeinwirkung und UV-Bestrahlung denaturierend wirken, muß festgehalten werden, daß der Wirkungsmechanismus bei beiden unterschiedlich ist und somit differente Befunde möglich sind.

Bei Erhitzung fand sich zuerst eine Beeinträchtigung der Nachweisbarkeit des der Subklasse IgG 3 angehörenden Merkmals Gm (21). Auch bei UV-Bestrahlung erwies sich das Merkmal Gm (21) als am empfindlichsten. Dies konnte nicht allein darauf zurückzuführen sein, daß die Subklasse IgG 3 nur ca. 8% der gesamten IgG-Fraktion ausmacht. Denn das trifft in gleicher Weise für das Merkmal Gm (5) zu, das erst bei höheren Temperaturen beeinträchtigt wurde. Dennoch müssen auch quantitative Unterschiede der einzelnen Merkmale mit berücksichtigt werden, wie sich aus der Verdünnungsreihe des Serummischpools ergibt (Tab. 26). Dies gilt um so mehr, als durch die Erhitzung der Spuren eine Bindung von Immunglobulinen an die Textilfaser aufgetreten sein dürfte, was den Nachweis zusätzlich erschwert und natürlich in besonderem Maße die Konzentration in der Subklasse IgG 3 verringerte. Von LITWIN und BALABAN wird die relative Labilität von IgG 3 bei Erhitzung erwähnt. Außerdem fand LITWIN bei der quantitativen Bestimmung der Hämagglutinationshemmung nach Erhitzen von Seren (63°C, 10 Minuten) eine Abnahme der hemmenden Eigenschaften des Merkmals Gm (4), nicht aber von Gm (1).

Der Vergleich der Ergebnisse bei den verschiedenen Spurenträgern zeigt, daß der Nachweis auf Wolle am besten und am schlechtesten auf Baumwollstoff gelang. Dies könnte jedoch quantitativ

bedingt sein durch unterschiedliche Absorption der Spuren an den Spureenträger. Es wurde nämlich beobachtet, daß Wollstoff das Blut stark absorbierte. Bei Baumwolle und Synthetik kam es dagegen zu einer starken Ausbreitung der Spuren, so daß Wollstoff pro cm^2 die größte Spurenmenge band.

Interessant war auch die Tatsache, daß eine lineare Abhängigkeit der Merkmalsnachweise von der Erhitzungstemperatur nicht besteht.

Bei sehr starken Erhitzungen scheinen Störfaktoren durch die denaturierten Proteine aufzutreten. Jedenfalls wurde bemerkt, daß die Agglutinationen bei Gm-negativen Proben später auftraten, was möglicherweise durch konkurrierende Reaktionen denaturierter Eiweißkörper innerhalb oder außerhalb der aktiven Zentren verursacht wurde. Auch bei geringen Spurenmengen und starker Verdünnung von Antiseren kann es bei Gm-negativen Proben zur Spättagglutination kommen. Wenn man von der Hypothese ausgeht, daß die Agglutinationshemmung durch Bindung von Antigenen und Antikörpern zustandekommt, hängt diese Reaktion in hohem Maße von den sogenannten Van der Waals'schen Kräften ab (HUMPHREY), die bei einem Abstand von $5 \text{ \AA}$ am stärksten sind (RAPOPORT) und mit der 6. Potenz zum Abstand der Moleküle abfallen. Bei geringeren Immunglobulin- und Antiserumkonzentrationen nimmt mit dem Abstand somit auch die Bindungsgeschwindigkeit ab. Das Phänomen der Spättagglutination ist aber um so mehr von Bedeutung, als dadurch bei Nichtbeachtung der erforderlichen Verlängerung der Inkubationszeiten auch bei geeigneter Konzentration des Antiserums ein Gm-positives Ergebnis vorgetäuscht werden kann. Um sicher zu gehen, sollte man daher bei sehr geringen erhitzten Spurenmengen

die Inkubationszeiten mindestens 1/2 Stunde verlängern.

Neben unterschiedlichen Denaturierungsempfindlichkeiten einzelner Merkmale waren auch individuelle Unterschiede in der Nachweisbarkeit derselben Gm-Merkmale aufgefallen. Sie konnten nicht durch den Spureenträger bedingt sein, da diese für alle untersuchten Proben identisch waren. Am ehesten sind individuelle quantitative Unterschiede dafür verantwortlich zu machen. Eine quantitative Bestimmung an Gm-heterozygoten und -homozygoten Seren (LITWIN und BALABAN) ergab, daß Heterozygote nur die Hälfte der Gm-Faktoren-Konzentration für ein bestimmtes Merkmal aufwiesen wie Homozygote. Aber auch innerhalb der genetischen Gruppen wurden erhebliche, zum Teil mehr als zehnfache Konzentrationsunterschiede nachgewiesen!

Andere Ursachen für unterschiedliche Immunglobulinkonzentrationen wurden bereits von JORCH und OEPEN erwähnt: hier muß insbesondere der bei Normalpersonen (über 1⁰/oo) vorkommende selektive IgA-Mangel erwähnt werden, der den Inv (1)-Nachweis beeinflussen kann.

Die Frage der Reversibilität der Denaturierung wurde in Kap. II, 3 beleuchtet, konnte jedoch nicht erschöpfend beantwortet werden. Trotz stark verdünnter Antiseren konnte jedenfalls bei den auf 160°C erhitzten Spermaspuren auf Baumwollstoff bis auf eine Ausnahme der Faktorennachweis nicht geführt werden, was bei 120°C noch in jedem Fall möglich war. Dies könnte als Ausdruck einer irreversiblen Denaturierung gewertet werden.

Bei UV-Bestrahlung sind bisher keine Veränderungen von Merkmalen beschrieben worden. So hatte die zehnstündige Bestrahlung von in Kochsalzlösung eluierten, getrockneten Blutspuren auf

Glasplatten mit Hochdruckquarzbrenner (50 cm Abstand, FÜNFHAUSEN, SAGEN und SCHRAMM) den Nachweis von Gm (1) und Gm (2) nicht beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu wurde bei den vorliegenden Untersuchungen nach erheblicher Verlängerung der Bestrahlungsdauer und Verkürzung des Bestrahlungsabstandes eine Beeinträchtigung der agglutinationshemmenden Merkmale, insbesondere von Gm (1), Gm (5), Gm (10), Gm (21) und Inv (1) festgestellt. Ursache dürfte eine irreversible Denaturierung sein. Auch eine zusätzliche Substratminderung durch Bindung von Immunglobulin an den Spureenträger muß diskutiert werden. Bei UV-Bestrahlung von Spermaspuren fiel bei den vorher gut nachweisbaren Merkmalen eine der Bestrahlung der Blutspuren entsprechende Beeinträchtigung der Nachweisbarkeit von Gm (1) und Gm (5) auf. Interessant ist, daß das in Gebrauchsverdünnung untersuchte Handelspräparat Intraglobin (Mischpool aus 1000 Spendern), das u. a. unter Kaltsterilisation (UV-Bestrahlung) hergestellt wird, Gm-(5)-negativ ist (obwohl über 90% der Bevölkerung Gm-(5)-positiv sind).

Hervorgehoben werden muß, daß die beobachteten Veränderungen nur bei unphysiologisch langer und intensiver Bestrahlung auftraten und daß ebenso wie bei der Erhitzung keine falsch-positiven Ergebnisse auftraten.

Bei Feuchtigkeitseinwirkung wurden neben falsch-negativen auch falsch-positive Ergebnisse ermittelt. Eine Veränderung von Merkmalen trat nur auf, wenn ein Schimmelpilzbefall nachzuweisen war. LENOIR und MULLER fanden nach längerer Exposition von Blutspuren auf Textilien in einem feuchten Keller ebenfalls falsch-negative, aber keine falsch-positiven Ergebnisse, die Lagerung erfolgte aber wahrscheinlich nicht bei Zimmertempera-

tur und bei geringerer Luftfeuchtigkeit. Ein Schimmelpilz- oder Bakterienbefall wurde von ihnen nicht beobachtet, kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Es will nämlich nicht recht einleuchten, daß die Feuchtigkeitseinwirkung allein bei den erstaunlich hitze- und lagerungsstabilen Immunglobulinen IgG und IgM eine stärkere Beeinträchtigung darstellt als die Lagerung von Seren im Kühlschrank. Wahrscheinlicher sind schädigende Wirkungen von pflanzlichen und tierischen Lebewesen, von denen einige ja gerade auf Blut hervorragend gedeihen, was u. a. ihren mikrobiologischen Nachweis ermöglicht. Da der Schimmelpilzbefall offensichtlich war, wurde auf weitere Differenzierung der Pilzgattung bei den vorliegenden Arbeiten verzichtet. Bei der Einwirkung von Schimmelpilzen in feuchtem Milieu kam es zur unterschiedlichen Beeinträchtigung aller untersuchten Merkmale, die nach den Beobachtungen auf nur zum Teil unterschiedlichen Schimmelpilzbefall zurückgeführt werden kann. Da die Exoenzyme der Pilze die Immunglobuline schon allein infolge unterschiedlicher Konzentration derselben nicht in gleicher Weise schädigen können, sind unterschiedliche Beeinträchtigungen erklärlich. Theoretisch ist auch eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Peptidstrukturen in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz denkbar. Die Pilzsubstanz selbst wies keine die Gm- und Inv-Antiseren hemmenden Eigenschaften auf.

Das Merkmal Gm (21) erwies sich auch hier als empfindlicher als alle anderen Merkmale. Das Merkmal Gm (4), das im konstanten Fd-Teil der schweren Kette lokalisiert war, war besonders stabil. Die falsch-negativen Ergebnisse waren auch bis zur siebentägigen Feuchtigkeitsexposition selten.

Eine zunehmende Beeinträchtigung von Merkmalen in Abhängigkeit von der Zeit war erkennbar. Bei 28tägiger Exposition waren alle positiven Merkmale nicht mehr nachweisbar.

Die Erklärung der falsch-positiven Befunde ist schwierig. Wenn man von der Voraussetzung ausgeht, daß eine bestimmte sterische Konfiguration bzw. Ladungsverteilung der aktiven Gruppe(n) die Agglutinationshemmung ermöglicht, sind theoretisch durch die Andauung der Proteine auch Konformationsänderungen denkbar, die ein negatives Merkmal positiv werden lassen.

Die veränderten Proteine könnten aber auch mit den Anti-D-Gm-Determinanten reagieren und die Bindungsstelle für das Antiserum blockieren oder durch Denaturierung Affinitäten zum Antiserum zeigen, das dann für die Agglutination ausfällt.

Es bleibt die Frage offen, ob die von STEINBERG und STAUFFER und von anderen Autoren beobachteten Veränderungen an längere Zeit tiefgekühlten Seren auf demselben Mechanismus beruhen könnten, und ob es sich um eine Denaturierung handelt. KÜHN erwähnt die Auffaserung des Präzipitatbogens in der Immunelektrophorese für IgG nach längerer Lagerung im Tiefkühlfach und betrachtet dies als Ausdruck beträchtlicher Denaturierungserscheinungen.

Daraus läßt sich jedoch nicht entnehmen, ob hier alle IgG-Subklassen in gleicher Weise betroffen sind. Dies ist zum mindesten zweifelhaft, weil schon die Immunglobulinklassen erhebliche Unterschiede in der Lagerungsstabilität aufweisen. So fragmentiert z. B. IgD spontan beim Abstehen des Serums. Von ADINOLFI und PUTNAM wird die ausgeprägte Hitzelabilität von IgM erwähnt. Das Immunglobulin E wird durch einstündige Erhitzung auf 56°C inaktiviert (HUMPHREY).

Die besondere Empfindlichkeit von IgG 3 ist bekannt und wurde auch durch die vorliegenden Untersuchungen bestätigt. Es überrascht also nicht, in der älteren Literatur allein bei Gm (6) falsch-negative Ergebnisse zu finden (STEINBERG und STAUFER).

Die Tatsache, daß die Bestimmung auch bei Kochsalzverdünnung nicht gelang, könnte bedeuten, daß der Faktor Gm (6) eine erhebliche, wenn nicht irreversible Denaturierung erfahren hatte. Die falsch-positiven Ergebnisse können nicht als Supplementwirkung erklärt werden, da die Hemmwirkung in verschiedenen Titerstufen nachweisbar war.

Da die Natur der antigenen Determinanten noch unbekannt ist (BURNET), wäre es vermessen, die Änderungen der Gm-Eigenschaften lediglich auf Änderung der Struktur des Proteinanteils der Immunglobuline zu beziehen. Der Kohlenhydratanteil, der bei IgG 2,9%, bei IgM 10,9% beträgt, könnte neben stabilisierenden Eigenschaften auch direkt zur antigenen Determination beitragen. Von Bakterienantigenen weiß man, daß Di- und Trisaccharide die bedeutendsten Antigene darstellen (BURNET). So muß die Lösung dieses Fragenkomplexes weiteren Untersuchungen anderer Disziplinen vorbehalten bleiben.

C. Zusammenfassung

Die Bestimmbarkeit der Faktoren Gm (1), (2), (4), (5), (10), (21) und Inv (1) wurde an Blut- und Spermaspuren nach Einwirkung von Hitze, UV-Bestrahlung und Feuchtigkeit geprüft.

Von 30 untersuchten Personen wurden 8 Probanden mit unterschiedlichen Gm- und Inv-Mustern als Blutspender ausgewählt. Spermaproben konnten von 6 Probanden gewonnen werden.

Die Blutspuren wurden am Stofflappen aus Baumwolle, Wolle und Synthetik angelegt. Die Spermaspuren konnten wegen der geringeren Substanzmenge nur auf Baumwollstoff untersucht werden. Der Einfluß des Spurenträgers wurde im Versuch mit den erhitzten Blutspuren ermittelt.

An Blutspuren wurden folgende Befunde erhoben:

Etwa 2 cm² Spurenstoff wurde für die Bestimmung der 7 Faktoren benötigt.

Nach Erhitzung der Spuren kamen falsch-negative Ergebnisse zuerst bei einstündiger Einwirkung von 85°C vor. Am empfindlichsten war der Faktor Gm (21), gefolgt von Gm (10), (1), (2), (4) und Inv (1) bei längerer Exposition und Steigerung der Temperatur auf 120°C. Gm (5) war wider Erwarten am stabilsten und wurde als letzter Faktor erst bei dreistündiger Einwirkung von 120°C irritiert. Falsch-positive Befunde wurden nach Hitze-Exposition in keinem Fall, auch nicht bei Temperaturen von 200°C beobachtet.

Die Veränderungen traten bei Blutspuren auf Baumwolle früher und häufiger auf als bei Spuren auf Synthetik und waren

bei Spuren auf Wolle am geringsten ausgeprägt. Hier hat sich vermutlich die höhere Spurenkonzentration pro Flächeneinheit günstig ausgewirkt.

Auch nach UV-Bestrahlung kam es nur zu falsch-negativen Ergebnissen, und zwar ab einer Bestrahlungsdauer von 24 Stunden. Die Veränderungen wurden nur nach unphysiologisch hohen Bestrahlungsdosen beobachtet, die in der Natur nicht vorkommen. Auch hier war der Faktor Gm (21) zuerst betroffen. Nach 48stündiger Bestrahlung ergaben sich zusätzlich falsch-negative Reaktionen der Faktoren Gm (1), (10) und Inv (1). Nach 120 Stunden wurde auch Gm (5) beeinträchtigt.

Nach Feuchtigkeits-Einwirkung bei Zimmertemperatur wurde ein anderes Verhalten der geprüften Merkmale beobachtet: Hier traten auch falsch-positive Resultate auf: zweimal bei dem Nachweis von Gm (2) und einmal bei Gm (5). Falsch-negative Befunde betrafen alle Merkmale, am häufigsten Gm (21). Schon nach 5 Tagen waren die Spuren von Schimmelpilzen befallen, die wohl als verantwortlich für die Alterationen anzusehen sind. Die Pilzsubstanz selbst reagierte mit den Antiseren nicht positiv. Auch die Spureenträger waren indifferent.

Für die Untersuchung der 7 geprüften Merkmale an Spermaspuren wurden 4 cm^2 benötigt. Hier ergaben sich zunächst methodische Schwierigkeiten, die den Nachweis der Faktoren Gm (10), Gm (21) und Inv (1) behinderten. Sie wurden behoben durch Verdünnung der Antiseren und spätere Ablesung nach längerer Reaktionszeit.

Bei dieser modifizierten Technik traten falsch-negative Ergebnisse nach einstündiger Erhitzung auf 120°C noch nicht auf,

sondern erst bei Einwirkung von 160°C, die dann allerdings den Nachweis aller Faktoren störte.

UV-Bestrahlung rief nach 12 Stunden eine Beeinträchtigung hervor.

Feuchtigkeit wirkte sich innerhalb von 2 Tagen (noch) nicht aus. Falsch-positive Befunde wurden an Spermaproben in keinem Fall beobachtet.

Insgesamt nahmen die Fehlbestimmungen erwartungsgemäß etwa proportional zur Intensität und Einwirkungsdauer der schädigenden Noxen zu.

Die Ursachen der beschriebenen Veränderungen werden anhand der zitierten einschlägigen Literatur ausführlich erörtert. Danach beruht die Denaturierung durch Hitzeeinwirkung auf einem anderen Wirkungsmechanismus als die durch UV-Bestrahlung. Als begünstigende Ursachen der Fehlresultate kommen neben quantitativen Unterschieden der IgG-Unterklassen auch qualitative sowie individuell ausgeprägte Differenzen in Betracht. Ferner muß bei Hitze-Einwirkung mit einer vermehrten Bindung der Blutbestandteile an den Spureenträgern gerechnet werden. Es ist auch anzunehmen, daß die denaturierten Proteine selbst Störfaktoren darstellen und an verzögerten Agglutinationen mitbeteiligt sind. Die bei Feuchtigkeits-Exposition festgestellten Veränderungen sind offenbar durch Schimmelpilze bedingt.

D. Literatur

- ADINOLFI, M.: Some serological characteristics of normal incomplete cold antibody. Immunology 9, 31, 1965
- ADINOLFI, M.: Further attempts to characterize the normal incomplete cold antibody. Immunology 9, 365, 1965
- ADINOLFI, M.: Classification of bloodgroups. Immunology 5, 566, 1962
- BLINK, H., HOFSTETTER, R. BÖWERING, R. BUTTLER, M. HARTMANN und F. J. MARX: Immuoelektrophorese des Ejakulats. Münch. med. Wschr. 116, 35-38, 1974
- BRANDZAEG, FJELLANGER, I., GJERALDSEN, S. T.: Human Secretory Immunglobulins, I. Salivary secretions from individuals with normal or low levels of serum immunoglobulins. Scand. J. Haemat., Suppl. 12, 1-83, 1970
- BURNET, S. M.: Körpereigene und körperfremde Substanzen bei Immunprozessen. Stuttgart (Thieme) 1973
- EDELMANN, G. M.: Antibody structure and molecular immunology. In: Advances in Clinical Chemistry, Vol. 16, 1973
- FRANGIONE, B., MILSTEIN, C., PINK, J.: Immunoglobulins. Nature, Vol. 221, 145-154, 1969
- FÜNFHAUSEN, G., SAGEN, Z., SCHRAMM, H.: Über den Nachweis von Gm in Blutspuren. Z. gerichtl. Med. 53, 18-27, 1962
- GAARDER, P. I., NATVIG, J. B.: The Reaction of Rheumatoid Anti-Gm Antibodies with Native and Aggregated Gm-Negative IgG. Scand. J. Immunol. 3, 559-571, 1974
- GRUBB, R.: Hereditary gamma globulin groups in man, p. 264. In: Biochemistry of Human Genetics, London (Churchill) 1959
- GRUBB, R.: The Genetic Markers of Human Immunglobulins. Berlin-Heidelberg-New York (Springer) 1970
- HENNIG, A., RACKWITZ, A.: Untersuchungen über die praktische Anwendung der Sekretorbestimmung mittels einer Filterstreifenmethode. Die Heilberufe, H 1, 11-13, 1961
- HUMPHREY, J. H., WHITE, R. G.: Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Stuttgart (Thieme) 1972

- JORCH, G.: Untersuchungen über den Nachweis der Faktoren Inv (1), Gm (1), Gm (2), Gm (4), Gm (5) und Gm (21) an Speichel, Schweiß, Nasensekret und Sperma. Diss. Marburg 1976
- KLOSE, I., SCHRAVEN, J.: Die Bestimmung von Gm^(a) in Sperma. Z. gerichtl. Med. 52, 610-614, 1961/62
- KÜHN, R. A.: Immunelektrophoresefibel. Stuttgart (Fischer) 1974
- LENOIR, L., MULLER, P. H.: Determination des groupes Gm sur taches de sang. Ann. méd. lég. 46, 191-193, 1965
- LEONHARDT, H. H.: Untersuchungen über optimale Verfahren zum Nachweis von Blut- und Serumgruppenmerkmalen in Spermaflecken. Diss. Marburg 1968
- LITWIN, S. D.: A quantitative method for determining human G allotype antigens (Gm). J. Immunol. 106, 589-597, 1971
- LITWIN, S. D., BALABAN, S.: A quantitative method for determining human G allotype antigens (Gm). J. Immunol. 108, 991-999, 1972
- LÜBKE, K., SCHRÖDER, E., KLOSS, G.: Chemie und Biochemie der Aminosäuren, Peptide und Proteine I und II. Stuttgart (Thieme) 1975
- MERLI, S., RONCHI, G., MARCHIORI, A.: La determinazione su machie di sangue dei fattori Gm (a), Gm (b), Gm (x). Zacchia 60 (1965)
- MILSTEIN, C. P., FEINSTEIN, A.: Immunoglobulins. Nature 221, 145-154, 1969
- NIELSEN, J. C., HENNINGSSEN, K.: Note on the possibility of demonstrating the Gm-factors in semen. Med. Sci. Law 3, 272-274, 1963
- OEPEN, I.: Zur Blutgruppenprägung menschlicher Körpergewebe (Habilitationsschrift, Marburg 1973). Fortschr. Hämatol. 4, 255-291, 1977
- PROKOP, O., GÖHLER, W.: Die menschlichen Blutgruppen. Stuttgart (Fischer) 1976
- PROKOP, O., UHLENBRUCK, G.: Lehrbuch der menschlichen Blut- und Serumgruppen, Leipzig (VEB Thieme) 1966
- RAPOPORT, S. M.: Medizinische Biochemie. Berlin (VEB) 1965
- RÜMKE, P.: The origin of immunoglobulins in semen. Clin. exp. Immunol. 17, 287-297, 1974
- SCHLEYER, F. OEPEN, I.: Leitfaden der gerichtlich-medizinischen Blutspuren-Untersuchung. ²Lübeck (Schmidt-Römhild) 1977

Lebenslauf

Am 15. September 1944 wurde ich als Sohn des Facharztes für Neurologie und Psychiatrie Ernst Friedrich und seiner Ehefrau Margarethe, geb. Maschmeyer, in Münster (Westfalen) geboren. Im Februar 1964 legte ich das Abitur in Münster am Schlaun-Gymnasium ab. Nach der naturwissenschaftlichen Vorprüfung (15.4.1965) an der Universität Marburg bestand ich die ärztliche Prüfung am 26.2.1970. Die dadurch gewonnenen theoretischen Kenntnisse wurden erweitert durch die jeweils viermonatige Ausbildung in der Klinik für Nuklearmedizin, Chirurgischen Universitätsklinik und Medizinischen Universitätsklinik Marburg. Seit dem 15. April 1971 war ich unter Professor Eicke Assistenzarzt im Psychiatrischen Krankenhaus Marburg. Am 28. April erhielt ich die Approbation als Arzt. Seit dem 15. Oktober 1971 arbeitete ich als Assistenzarzt auf der Inneren Abteilung des Stadtkrankenhauses Korbach. Vom Mai 1972 bis 30. Juni 1973 absolvierte ich meine Wehrdienstzeit als Stabsarzt in Stadt Allendorf. Seit dem 1.8.1973 bin ich Stationsarzt in der Hessenklinik Schwalmstadt unter Chefarzt Melzer, wo ich neben der Stationsarbeit auch in der Röntgenabteilung tätig bin. Die abschließende Ausbildung zum Facharzt für Innere Medizin wird in Wuppertal/Elberfeld an den Ferdinand-Sauerbruch-Krankenanstalten (Professor Jahnke) erfolgen.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Dozenten:

Becker, Beckmann, Berendes, Betz, Bommer, Brück, Buchholz, Cleve, Dimroth, Dittrich, Dölle, Drawert, Du Mesnil de Rochemont, Exner, Ganz, Gedigk, Golenhofen, Graul, Hamm, Hardewig, Hensel, Hettler, Heuser, Hildebrandt, Jacob, Karlson, Knauff, Korb, Kreutz, Kuransky, Lang, Linneweh, Löhr, Mahr, Mann, Margescu, Martini, Marx, Mattes, Nocke, Petry, Petzold, Pots, Rassner, Rodek, Rodenhäuser, Rohen, Seidel, Siegert, Schaumlöffel, Schirren, Schleyer, Schmid, Schmitz-Moormann, Schwaiger, Staib, Straub, Streicher, Vogt, Voss, Walcher, Wendt, Zilliken.

